

日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

03.08.00

JP00/5210

TELE CENTER 16092000
as filedRECEIVED
APR 08 2002

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 9月17日

出願番号

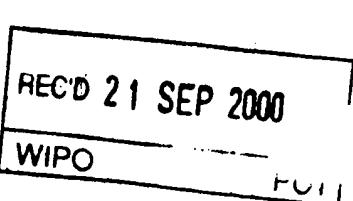
Application Number:

平成11年特許願第264687号

出願人

Applicant(s):

サントリー株式会社

4
BEST AVAILABLE COPY

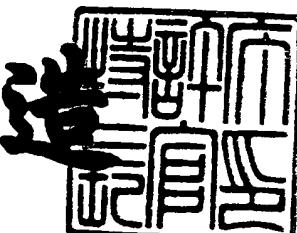
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3071071

【書類名】 特許願
 【整理番号】 991688
 【提出日】 平成11年 9月17日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【国際特許分類】 A61K

【発明者】

【住所又は居所】 青森県中津軽郡岩木町大字駒越字村元31番1号
 【氏名】 長内 智宏

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー
 株式会社内

【氏名】 孫田 浩二

【特許出願人】

【識別番号】 000001904
 【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705
 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2
 06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫
 【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9706781

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 カップリングファクター6阻害剤および賦活剤ならびにその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カップリングファクター6（以後CF6と記す）阻害剤を有効成分とする血液中のCF6の過剰に起因する疾患の予防薬または治療薬。

【請求項2】 CF6阻害剤がCF6分泌抑制物質またはCF6アンタゴニストである請求項1に記載の予防または治療剤。

【請求項3】 血液中のCF6の過剰に起因する疾患が、心筋梗塞、狭心症、心不全、肺高血圧、高血圧症、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、動脈硬化、高脂血症、糖尿病、気管支疾患、胃潰瘍、妊娠子瘤、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病である、請求項1または請求項2に記載の予防薬または治療薬。

【請求項4】 CF6賦活剤またはCF6を有効成分とする血液中のCF6の不足に起因する疾患の予防薬または治療薬。

【請求項5】 CF6賦活剤がCF6分泌促進物質またはCF6アゴニストである請求項4に記載の予防または治療剤。

【請求項6】 血液中のCF6の不足に起因する疾患が脳梗塞、急性肺炎、喘息、ARDS、慢性関節リウマチを含む炎症性疾患である、請求項4または請求項5に記載の予防薬または治療薬。

【請求項7】 CF6阻害剤を有効成分とするPGI₂の不足に起因する疾患および／またはCa²⁺依存性細胞質型PLA₂（cPLA₂）の作用の減弱に起因する疾患の予防薬または治療薬。

【請求項8】 CF6阻害剤がCF6分泌抑制物質またはCF6アンタゴニストである請求項7に記載の予防または治療剤。

【請求項9】 PGI₂の不足に起因する疾患および／またはcPLA₂の作用の減弱に起因する疾患が、心筋梗塞、狭心症、心不全、肺高血圧、高血圧症、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、動脈硬化、高脂血症、糖尿病、気管支疾患、胃潰瘍、妊娠子瘤、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病である、請求項7または請求項8に記載の予防薬または治療薬。

【請求項10】 CF6賦活剤またはCF6を有効成分とする、PGI₂の過剰に起因する疾患および／またはcPLA₂の作用の亢進に起因する疾患の予防薬または治療薬。

【請求項11】 CF6賦活剤がCF6分泌促進物質またはCF6アゴニストである請求項10に記載の予防または治療剤。

【請求項12】 PGI₂の過剰に起因する疾患および／またはcPLA₂の作用の亢進に起因する疾患が、脳梗塞、急性肺炎、喘息、ARDS、慢性関節リウマチを含む炎症性疾患である、請求項10または請求項11に記載の予防薬または治療薬。

【請求項13】 採取した血液サンプル中のCF6濃度を測定することを特徴とする、血液中のCF6の過剰または不足に起因する疾患の診断方法。

【請求項14】 採取した血液サンプル中のCF6濃度を測定することを特徴とする、血液中のCF6の過剰または不足に起因する疾患の診断方法に用いる抗CF6抗体からなる診断助剤。

【請求項15】 抗CF6抗体が、ヒトCF6（配列番号1）またはラットCF6（配列番号2）の全部または一部を抗原として作製されたものである請求項14に記載の診断助剤。

【請求項16】 CF6またはその部分ポリペプチドの遺伝子組換え技術による製造方法であって、該CF6またはその部分ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列がN末端にエンテロキナーゼ認識部位をコードするポリヌクレオチド配列を介して保護ペプチドと結合したキメラタンパク質をコードするDNAを含むベクターで形質転換された宿主を培養し、得られたキメラタンパク質をエンテロキナーゼで処理してCF6またはその部分ポリペプチドを製造する方法。

【請求項17】 血液中CF6の過剰または不足に起因する疾患への罹病し易さの診断方法であって、該患者のゲノム中のCF6遺伝子領域における遺伝子配列の変異の有無を決定することを含む方法。

【請求項18】 血液中CF6の過剰または不足に起因する疾患が、PGI₂の不足または過剰と関連する疾患である請求項17記載の方法。

【請求項19】 血液中CF6の過剰または不足に起因する疾患が、cPLA₂作用

の亢進または減弱と関連する疾患である請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、血液中のCF6量の変化に起因する疾患、PGI₂の過剰または不足に起因する疾患、ならびにcPLA₂作用の亢進または減弱に基づく疾患において、疾患の発症、進展を判断するための診断方法および診断助剤、ならびに該疾患に対する治療薬に関する。また、本発明は、CF6またはその部分ポリペプチドをコードするDNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体およびCF6およびその部分ポリペプチドの効率的な製造方法、CF6に特異的に反応する抗体およびその製造方法、CF6の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

アラキドン酸カスケードを経て產生される、プロスタグランジン（PG）、トロンボキサン（TX）およびロイコトリエン（LT）のようなプロスタノイドは、生体の恒常性維持に必要な生理活性物質である。プロスタノイドの一員であるプロスタサイクリン（PGI₂）は、血管内皮細胞において、シクロオキシゲナーゼ、プロスタグランジンH₂（PGH₂）合成酵素によりアラキドン酸から生成されたPGH₂に、さらにPGI₂合成酵素が働き、生成される。

【0003】

このPGI₂の薬理作用に関しては、

- (1) PGI₂は膜上のPGI₂レセプターに結合してアデニールシクラーゼを活性化させcAMPを生成することによって、血小板凝集抑制作用、血管拡張作用を示す（中畠ら薬局50:1365-1373、1999）こと、
- (2) PGI₂は血管の内皮障害に起因する血栓形成に重要な役割を果たす（Murata、T. et al. Nature 388:678-682、1997）こと、
- (3) PGI₂が炎症浮腫を引き起こす主要なプロスタノイドである（Murata、T. et al. Nature 388:678-682、1997）こと、などが知られている。

【0004】

このように、PGI₂の生合成経路と生合成に関する酵素群（アラキドン酸カスケード）が同定され、PGI₂の生理活性作用はある程度判ってきた。しかしながら、疾患におけるPGI₂産生制御の機序については知られていない。

【0005】

一方、PGI₂の産生制御に関しては、高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた実験によって、SHRには内因性PGI₂産生抑制物質が存在することが示唆された（Osanai、T. et al. Jpn. Circ. J. 54, 507-514, 1990, Falardeau、P. et al. Prostaglandins, 29, 621-628, 1985）。この内因性PGI₂産生抑制物質に関しての検討は、未だ充分ではないが、発明者らは、SHRの腸管膜動脈由来平滑筋細胞が分泌するPGI₂産生を抑制する因子を、SHRの心臓から単離精製することに成功した。さらにその構造を決定し、この因子がH⁺輸送性ATP合成酵素のサブユニットの一つであるラットCF6（以後rCF6と記す）であることを解明した（参考例1）。

【0006】

哺乳類のH⁺輸送性ATP合成酵素は、ミトコンドリア内膜に存在し、少なくとも14のサブユニットからなる。CF6は該酵素のサブユニットの一つであり、76アミノ酸からなる。CF6はN末端に、ミトコンドリア移行配列を含む32アミノ酸が付加したペプチドとして合成される（Higuchi、T. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178 793-799, 1991）。

【0007】

これまでに本発明者らは、ファクターXaによりrCF6が切り出し可能なキメラタンパク質を大腸菌を宿主として発現させ、キメラタンパク質からrCF6切り出し、精製する方法を確立した（参考例2）。

【0008】

更に本発明者らは、CF6によるPGI₂産生阻害の作用点はPLA₂阻害（参考例3）、特に、cPLA₂阻害であること（参考例4）を明らかにした（Osanai、T. et al. J. Biol. Chem. 273, 31778-31783, 1998）。しかし、細胞内のペプチドであるCF6と疾患の関係に関しては全く知られておらず、CF6がイン・ビボにおいて血管内皮に作用する状態、すなわち血液中に存在するか否かについてすら不明で

あった。

【0009】

また、一方で、cPLA₂の機能については、

(1) アラキドン酸カスケードの炎症メディエーターであるプロスタグランジンE2、ロイコトリエンB4、ロイコトリエンC4の産生に必須であること、

(2) 該酵素欠損マウスでは、中大脳動脈の一過性の結紮後の梗塞領域が小さく、脳の

浮腫や神経欠落も少ないこと、

が明らかになってきた (Bonventre JV, T. et al. Nature 390:622-625, 1997)。このことから、cPLA₂の阻害薬は、強力な炎症治療薬や脳梗塞などの治療薬になると推測れているが、有効な治療薬や、CF6作用の制御に基づくcPLA₂阻害薬のスクリーニング方法は未だ見出されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

このように、アラキドン酸カスケードにおけるPGI₂の生合成や生理作用、cPLA₂の生理作用、およびPGI₂やcPLA₂とCF6との関係については、徐々に解明されてきた。しかし、アラキドン酸カスケードの末端に位置するPGI₂や、初端に位置するcPLA₂といった因子が関与する疾患の原因については、解明が進んでいない。

【0011】

本発明者らは、ラット血液中にはrCF6が存在すること、PGI₂の不足に起因する高血圧症において血圧の上昇とともに血中rCF6濃度が増加すること、この状態においてrCF6を投与すればさらに血圧が上がること、およびrCF6濃度が高い高血圧の状態において抗rCF6抗体が降圧作用を示すこと、の知見を得て本発明を完成するに至った。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上述のような実状に鑑み、CF6の血中濃度を調節することにより、

P G I₂やcPLA₂の作用を制御する手段を提供し、血液中のCF6量の変化に起因する疾患、P G I₂の過剰または不足に起因する疾患、ならびにcPLA₂作用の亢進または減弱に基づく疾患の予防薬または治療薬及びこれら疾患において、疾患の発症、進展を判断するための診断方法および診断助剤に関する。

【0013】

すなわち、本発明によれば、CF6、CF6分泌促進物質及びCF6アゴニストのようなCF6賦活剤、または、CF6分泌抑制物質及びCF6アンタゴニストのようなCF6阻害剤を有効成分とする、CF6の過剰または不足に起因する、P G I₂の過剰または不足に起因する疾患、ならびにcPLA₂作用の亢進または減弱に基づく疾患の予防薬または治療薬が提供される。また、血中のCF6濃度の測定方法が提供される。

さらに、CF6の過剰または不足に起因する疾患の診断方法及び診断助剤が提供される。

【0014】

また、本発明によれば、上記疾患の予防薬や治療薬の有効成分であるCF6分泌促進物質、CF6分泌抑制物質、CF6アゴニストまたはCF6アンタゴニストが提供される。さらに、血中CF6濃度の測定方法または診断方法の試薬または診断助剤として用いられる抗CF6抗体が提供される。また、本発明はCF6をコードするDNAを含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体およびCF6様ペプチドの製造方法に関する。本発明によれば、CF6やCF6の部分ポリペプチドに特異的に反応する抗体およびその製造方法が提供される。

【0015】

【発明の実施の形態】

(CF6の製造)

本発明において、上記の予防薬や治療薬の有効成分、または、血中のCF6濃度の測定方法または血中のCF6濃度が変化する疾患の診断方法の試薬または診断助剤として用いられるラットおよびヒトCF6は、切り出し酵素としてエンテロキナーゼを用いることで、従来法（参考例2）に比して効率よく製造できる。エンテロキナーゼは、Asp-Asp-Asp-Asp-Lys配列（配列番号3）を認識し、そのC末端のペプチド結合を切断する酵素である。CF6を取得するには、遺伝子組換え技術

の常法により、エンテロキナーゼの認識配列のN末端に保護ペプチドを、C末端にCF6またはその部分ペプチドを有するキメラタンパク質を得て、エンテロキナーゼによりCF6を切り出す。キメラタンパク質としては、例えば大腸菌 β -ガラクトシダーゼのN末端139アミノ酸からなるペプチド(76番目と122番目のアミノ酸システインがセリンに置換している：配列番号4)のC末端に、エンテロキナーゼの認識配列を介してCF6を結合したペプチドを用いることができる。この

キメラタンパク質は、大腸菌で不溶性分画に大量に蓄積されるため、効率よく、発現、精製することができる。CF6は、不溶性のキメラタンパク質を尿素溶液に可溶化後、エンテロキナーゼを作用させ、キメラタンパク質から切り出すことができる。CF6は、これをC18カラムを接続したHPLCに供し、精製できる。発現ベクターの作成、宿主の形質転換は当業者において常法により行うことができる(マニアティスら "モレキュラークローニングアラボラトリーマニュアル" コールドスプリングハーバラボラトリー1989年)。

(部分ポリペプチド)

本発明でいう部分ポリペプチドとは、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)からのPGI₂産生抑制作用を有するCF6の一部分からなるポリペプチドである。また、CF6の一部分を構成するポリペプチドに対して、1ないし数個のアミノ酸が欠損、1ないし数個のアミノ酸が付加、および、1ないし数個のアミノ酸が置換、並びにこれらの組み合わせにより修飾された、HUVECからのPGI₂産生抑制作用を有するポリペプチドを含む。

(CF6抗体の製造)

本発明において、上記の予防薬や治療薬の有効成分、または、血中のCF6の濃度の測定方法または診断方法の試薬または診断助剤として用いられる、CF6に対して免疫特異的な抗体は、CF6もしくはその断片またはそのアナログ、あるいはそれらを発現する細胞を免疫原として、動物、好ましくはヒト以外の動物を、通常の実験法を用いて感作することにより得ることができる。モノクローナル抗体を調製する場合には、連続的細胞系培養により產生される抗体を提供するハイブリドーマ法(Kohler, G. et al. Nature, 256:495-497, 1975)等を用いることができる。一本鎖抗体の產生に用いる技術(米国特許第4946778号)を適

用して、CF6に対する一本鎖抗体を產生できる。また、ヒトの抗体產生系を有するトランスジェニックマウス (Green LL. et al. Nat Genet. 7, 13-21, 1994) を用いて、ヒト型抗体を発現させることができる。本明細書には、r CF6由来またはhCF6由来の約20アミノ酸からなる断片のN末端にシステインを付加したペプチドを合成し、N末端のシステインを介してキーホールリンペットヘモシアニンと結合させたものを抗原としてウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を作製した例を示した（実施例2）。

（CF6濃度の測定方法）

また、本発明は、前述の抗体を用いることで、RIA法またはELISA法により試料中のCF6の測定方法を設定することが可能である（ラジオイムノアッセイ：北川 p 79-88、エンザイムイムノアッセイ：p 88-99、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原、抗体、補体、日本生化学会編集1992）。

その例として、本明細書では実施例2に、¹²⁵Iラベル化抗原と抗体との反応を、サンプル中の抗原により阻止することによって定量する拮抗阻害系（RIA法）を示している。

（CF6分泌促進物質またはCF6分泌阻害物質のスクリーニング方法）

また、本発明は、前述のCF6濃度の測定方法を用いることで、CF6分泌促進物質またはCF6分泌抑制物質を得ることができる。具体的には、CF6を分泌する細胞、例えば、HUVEC培養液中に、被験物質を添加し、培養液中に分泌されるCF6量を抗CF6抗体を用いた測定系、例えば、前述のRIA法により測定し、CF6量が増加するCF6分泌促進物質やCF6量が減少する分泌抑制物質を得ることができる。CF6を分泌する細胞は、疾患の原因となる細胞を用いることがさらに望ましい。

（CF6アゴニストまたはCF6アンタゴニストのスクリーニング方法）

また、本発明は、CF6アゴニスト、またはCF6アンタゴニストを見出すためのスクリーニング方法が得られる。

【0016】

具体的には、CF6によりPGI₂産生量が抑制される細胞、例えば、HUVECやラット腸管大動脈由来の平滑筋細胞培養液中に、被験物質をCF6と共に添加し

、培養液中に分泌されるPGI₂の安定代謝物である6-ケト-PGF_{1α}量を測定し、6-ケト-PGF_{1α}量が増加するCF6アンタゴニストや6-ケト-PGF_{1α}量が減少するアゴニストを得ることができる。また、標識したアラキドン酸存在下で、HUVEC培養液中に被験物質をCF6と共に添加し、培地中に遊離されるアラキドン酸を測定し、アンタゴニストやアゴニスト見いだしてよい。PGI₂産生細胞やアラキドン酸遊離は、疾患の原因となる細胞を用いることがさらに望ましい。

(CF6結合レセプターの同定方法)

また、本発明は、CF6結合レセプターの同定方法を提供する。CF6結合レセプターは、CF6を用いて、当該分野において既知の標準的なレセプター結合法により、同定することができる。これらの方法は、リガンド結合およびクロスリンクアッセイを包含するが、これらに限らない。これらの方法において、CF6は放射性標識（例えば¹²⁵I）、化学修飾（例えばビオチン化）または検出もしくは精製に適したペプチド配列に融合され、HUVEC等の細胞の膜画分とともにインキュベーションされる。また、標識されたCF6は、結合アッセイを用いて、CF6のそのレセプターへの結合と競争するCF6のアゴニストおよびアンタゴニストを同定する方法にも利用できる。このようなアッセイを行うための標準的方法は当該分野において周知である。

(疾患例)

本発明でいうCF6の過剰に起因する疾患とは、例えば、PGI₂が不足した疾患やcPLA₂作用の減弱した疾患があげられる。その例としては、血小板凝集が亢進した疾患あるいは血管拡張抑制による末梢循環障害を伴う疾患、心筋梗塞、狭心症、心不全、肺高血圧、高血圧症、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、動脈硬化、高脂血症、糖尿病、気管支疾患、胃潰瘍、妊娠子癪、溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病がある。

【0017】

本発明でいうCF6の不足に起因する疾患とは、例えば、PGI₂が過剰した疾患やcPLA₂作用が亢進した疾患があげられる。その例としては、脳梗塞、急性肺炎、喘息、ARDS、慢性関節リウマチを含む炎症性疾患がある。

(治療薬の提供)

本発明によれば、血液中CF6量が、過剰または不足であることに起因する上記のような症状の治療薬を提供することができる。

【0018】

CF6活性が過剰な場合、例えば、リガンド、基質、レセプター、酵素等へのCF6の作用を阻害するのに効果的な量のアンタゴニスト、あるいは、CF6分泌抑制物質を投与することで、CF6活性を低減することができる。これらアンタゴニストおよびCF6分泌抑制物質は、上記のスクリーニング方法により得る事ができる。

【0019】

一方、CF6の不足に起因する異常な症状を治療するために、リガンド、基質、レセプター、酵素等へのCF6の作用を促進するのに効果的な量のアゴニストを投与すること、あるいは、CF6分泌促進物質を投与することでCF6活性を増強することができる。これらアゴニストおよびCF6分泌促進物質は、上記のスクリーニング方法により得る事ができる。

(製剤の製造方法)

本発明のスクリーニング方法を用いて得られるCF6分泌促進物質、CF6分泌抑制物質、CF6アゴニストまたはCF6アンタゴニストを医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて皮膜を施した錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤などの固形剤として、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液に溶解または懸濁させた注射剤、点眼剤または経鼻剤として、あるいは軟膏剤、ハップ剤といった外用剤として使用できる。

【0020】

これらの製剤は通常用いられる添加剤を使用して通常の操作によって製造できる。錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤などの経口投与用の固形剤を製造する場合、添加剤として、例えば、(1) 乳糖、デンプンまたは結晶セルロースなどの賦形剤、(2) ヒドロキシプロピスセルロースやポリビニルピロリドンのような結合剤、(3) デンプン、クロスカルロースナトリウムのような崩壊剤、(4) マクロゴールやクエン酸トリエチルのような可塑剤、(5) ステアリン酸マグネシウムやタルクのような滑沢剤、(6) ヒドロキシプロピルメチルセルロース、

オイドラギットなどのコーティング基剤、(7)白糖やマンニトールのような矯味剤の他、矯臭剤、着色剤などを用いることができる。

【0021】

また、注射剤、点眼剤または経鼻剤を製造する場合は、添加剤として、(1)塩化ナトリウム、D-マンニトール、D-ソルビトールなど等張化剤、(2)塩酸、クエン酸などのpH調整剤、(3)クエン酸ナトリウムリン、酢酸ナトリウム、ホウ酸などの緩衝剤、(4)塩酸プロカインなど無痛化剤の他、安定化剤や界面活性剤を添加することができる。また、有効成分の安定性などを考慮して、用時溶解または用時懸濁して使用する製剤とするか、または液剤とするかを選択することができる。

【0022】

軟膏剤、ハップ剤といった外用剤の製造には、(1)流動パラフィン、ワセリン、親水軟膏など基剤、(2)ポリソルベート80、トラガントなどの乳化剤、(3)安息香酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸プロピルなどの保存剤、(4)塩酸プロカインなど無痛化剤の他、安定化剤や界面活性剤を添加することができる。

【0023】

調製された製剤は各剤形ごとに適した形態で包装される。例えば、瓶包装、分包、PTP包装、アンプル、バイアルにといった包装形態をとることが可能である。このようにして得られる製剤は、例えば哺乳動物（ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。投与量は、適応症、症状や投与経路などにより差異はあるが、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～300mg、好ましくは約0.1～100mgである。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

(診断方法)

また、本発明によれば、採取した血液サンプル中のCF6濃度を測定することにより、CF6の過剰または不足に起因する疾患の診断方法を提供する。CF6濃度は上述のように、抗体を用いたRIA法またはELISA法により測定することが可

能である。

(CF6遺伝子またはmRNA)

本発明によれば、CF6の過少発現、過剰発現、局在の変化、またはこれらの変化よりもたらされる疾患に対しての診断薬または診断助剤として使用可能なCF6遺伝子またはmRNAを使用することできる。

【0024】

CF6遺伝子に変異のある個体は、種々の方法によりDNAレベルで検出できる。診断に供する核酸は、対象の細胞、例えば、血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料より得ることができる。ゲノムDNAは、直接使用してもよく、または分析の前にPCRもしくはその他の增幅法を用いることにより増幅させてもよい。mRNAまたはcDNAもまた同じ方法で用いることができる。正常な遺伝子型との比較における増幅産物の大きさの変化により、欠失および挿入を検出できる。点突然変異は、増幅DNAを正常なDNA塩基配列を有するCF6DNAとハイブリダイズさせることにより同定できる。完全に対合した配列はRNase消化により、または融解温度の違いにより、誤対合二重らせんから区別できる。DNA配列の違いはまた、変性物質と一緒にまたは単独で電気泳動したときのDNA断片のゲル中での移動度の変化により、または直接DNA配列決定により検出できる。特異的位置での配列の変化は、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNaseおよびS1保護または化学的切断法によっても明らかにすることができる。あるいは、CF6の塩基配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイ(array)を構築して、例えば遺伝的変異の効果的なスクリーニングを行うことができる。アレイ法は周知であり、適用範囲が広く、その方法を用いて、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的変化を含め、分子遺伝学における種々の問題に取り組むことができる。

【0025】

【実施例】

以下に本発明を実施例をもってより具体的に示すが、これは本発明の実施態様の一つの例示であり、本発明はこれに限定されるものではない。なお、実施例中の学術用語、略号等は特に断らない限り当該技術分野で一般的に使用されている

ものに従った。本発明のための材料として用いたプラスミド、大腸菌および、各実施例に共通な基本的な実験操作を参考のために示した。また、本発明の基礎となった従来技術及び本発明の付帯技術を確認し、説明するために参考例を示した。

(プラスミド)

プラスミドpG97S4DhCT [G]は、 β -ガラクトシダーゼのN末端から97番目までのアミノ酸からなるペプチド（配列番号5：76番目のシステイン残基がセリン残基、40、41、71、と75番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換されている： β Ga1-97S4Dと呼ぶ）にGlu-Phe-Glu配列を介してhCT [G]（ヒトカルシトニンの32番目のアミノ酸のC末端にグリシンが付加したペプチド）が結合したキメラタンパク質を大腸菌ラクトースオペロンのプロモーターにより発現できるプラスミドである。このプラスミドによる形質転換株は、テトラサイクリン薬剤耐性で選択できる。目的とするペプチドをコードするDNA領域を読み替を合わせてEcoRI-Sal I DNA断片として導入すれば、 β Ga1-97S4Dとのキメラタンパク質を発現することができる。なお、このプラスミドを含有する大腸菌W3110株は、Escherichia coli S BM 323と命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号：微研条寄第3503号(FERM BP-3503)として1991年8月8日に寄託されている。

【0026】

プラスミドpGP#19RIは、pG97S4DhCT [G]の β Ga1-97S4D/hCT [G]キメラタンパク質をコードする遺伝子が、 β Ga1-139S（配列番号4）/hProPTHキメラタンパク質をコードする遺伝子に置換したプラスミドである。目的とするペプチドをコードするDNA領域を読み替を合わせてEco RI-Sal I DNA断片として導入すれば、 β Ga1-139Sとのキメラタンパク質を発現することができる。プラスミドpGP#19（特開平9-296000；図4）の保護ペプチド β Ga1-139SとhProPTHの結合部分をコードするDNA部分にEco RI部位を挿入し作製できる。

【0027】

プラスミドpCRIIは、Taq DNAポリメラーゼを用いてPCR法にて増幅したDNA断片と直接連結できる形でインビトロジェン（株）より購入した。プラスミドpCR IIによる形質転換株は、アンピシリン薬剤耐性で選択できる。

(大腸菌と培地)

大腸菌JM109株は東洋紡（株）から購入し、プラスミドの調製およびキメラタンパク質発現に利用した。

培地には、LB培地（0.5%（w/v）酵母エキス、1%（w/v）トリプトン、0.5%（w/v）NaCl）、SB培地（2%（w/v）酵母エキス、1%（w/v）トリプトン、0.5%（v/v）グリセロール、1.2%（w/v） K_2HPO_4 、0.3%（w/v） KH_2PO_4 ）を用いた。

(基本的な実験操作)

具体的に実施例に示さない場合は、実験操作は以下の方法に従った。DNA塩基配列はジデオキシ法/DNAシークエンサー373（アプライドバイオシステムズ（株））で決定した。制限酵素によるDNAの切断は購入先の指定する3～10倍量の酵素を用いて1時間反応させた。プラスミド構造の解析は0.5～1 μg DNAを用いて20 μL 反応液中で、DNAの調製には3～10 μg のDNAを用いて50～100 μL 反応液中で行った。反応温度、反応バッファー等の条件は購入先の指定に従った。得られたDNA断片はアガロースゲル電気泳動にて分離し、解析または調製した。

アガロースゲル電気泳動サンプルは、反応液に1/5容量の色素液（0.25%（w/v）プロムフェノールブルーを含む15%（w/v）Ficoll水溶液）を加え調製した。アガロースゲル電気泳動用バッファーにはTAEバッファー（10 mMトリス、20 mM酢酸、2 mM EDTA・Na、pH 6.8）を用いた。プラスミドの構造解析、およびDNA断片調製にはMupid-2（コスマバイオ（株））を用いて100ボルト1時間の泳動を行なった。ゲルはエチジウムプロミド水溶液（0.5 $\mu g/ml$ ）で20分染色した後、紫外線照射してDNAバンドを検出した。アガロースゲル濃度は、分画するDNA断片の大きさに合わせて、1.0、1.5、2.0%（w/v）を用いた。アガロースゲル中のDNAは、SUPREC-01（宝酒造（株））を用いてゲルから抽出した。DN

A溶液はフェノール処理後、エタノール沈殿を行った。ライゲーション反応は、0.05~1 μgのDNA断片を用い、TAKARA Ligation Kit（宝酒造（株））を用いて行なった。

【0028】

大腸菌の形質転換法は塩化カルシウム法で行い（JM109株はコンピテントな細胞を購入して使用）、形質転換株は薬剤耐性（アンピシリンまたはテトラサイクリン）で選択した。

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）は、Laemmli の方法に準じた（Laemmli et al. Nature 227, 680-685, 1970）。すなわち、試料に1/4容量の4×SDSサンプルバッファー（375 mMトリス塩酸（pH 6.8）、30%（v/v）グリセロール、7%（w/v）SDS、15%（v/v）2-メルカプトエタノール、0.1%（w/v）ブルムフェノールブルー）を加え、95℃、5分間加熱した。10 μLをSDS-ポリアクリルアミドゲル（55 mm × 85 mm × 1 mmまたはテフコ（株））に供し、20 mA、80分間の電気泳動を行った。泳動後、ゲルを染色液（10%（v/v）酢酸、40%（v/v）メタノール、0.25%（w/v）クマジーブリリアントブルーR250）で染色した。

C18カラムを用いたHPLCを用いたペプチドの解析および精製は、YMC-ODS-A302（d4.6mm×150mm）カラム、YMC-ODS-A323（（d10mm×250mm）カラム（以上ワイエムシー（株））、InertsilODS-2 C18（d4.6mm×250mm）カラム（GLサイエンス（株））を接続したHPLC（島津製作所（株）LC10A）を用い、A液（0.1%（v/v）トリフルオロ酢酸（TFA）、B液（0.092%（v/v）TFA/80%（v/v）アセトニトリル、または0.092%（v/v）TFA/60%（v/v）アセトニトリル）の濃度勾配で展開（流速1mL/分または2.5 mL/分）し、210 nmの吸光度測定にてピーク面積を計測し行った。

DNAオリゴマーは、グライナージャパン（株）またはライフテックオリエンタル（株）にて合成した。

PGI₂産生抑制活性は、SHRの腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞、または、

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）からの上清中へ分泌されるPGI₂の安定代謝産物（6-ケト-PGF₁ α ）を測定し、評価した。すなわち、SHRの腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞は、10%（v/v）ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で継代培養し、飽和細胞密度に達するまで培養した。HUVECsは、2%（v/v）ウシ胎児血清、10ng/ml EGF、5ng/ml bFGF、1μg/mlハイドロコルチゾン、10μg/mlヘパリン含有合成培地（HuMediaクラボウ（株））

で増殖させた。6-ケト-PGF₁ α は、SHRの腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞、またはHUVECを、測定試料を添加したDMEM培地中で30分間インキュベーションし、その間に上清へ分泌された量を測定した。

血圧は、75mg/kgケタミンと15mg/kgキシジラジン塩酸で麻酔したラット大動脈に直接カテーテルを挿入し、観血的に測定した。すなわち、20U/mlヘパリンを含む生理食塩水で満たした2本のポリエチレンカテーテルを左頸動脈と左大腿静脈に挿入し、左頸動脈に挿入したカテーテルをポリグラフに連動した圧力検出器（Carrier Amplifier AP-601G；日本光電（株））に接続した。サンプルは200μLの生理食塩水に溶解して大静脈から投与した。

各種機器、試薬等の使用方法は各々附属の使用説明書に従った。また、遺伝子操作に関する基本的操作は、マニアティスら“モレキュラークローニングアラボラトリーマニュアル”コールドスプリングハーバーラボラトリー1989年を参考にした。

[実施例1] キメラタンパク質発現法によるCF6の調製-1

キメラタンパク質からの切り出し酵素として、エンテロキナーゼを用いるCF6の製造方法の具体例を以下に示す。

rCF6および hCF6 cDNAの調製

rCF6 cDNAは、ラット肝臓cDNA（クイッククローン cDNAライブラリー、クロンテック（株））を録型とし、rCF6-01（配列番号6）およびrCF6-02（配列番号7）をプライマーとするPCR法により得た。すなわち、耐熱性DNAポリメラーゼにKOD（東洋紡（株））を用い、ラット肝臓cDNAライブラリー1μL、10x反応バッファー5μL、2mM dNTPミックス7.5μL、rCF6-01 0.5μL、rCF6-02 0.5μL、滅菌水35μLからなる反応液を96℃、30秒；56℃、1分；74℃、40秒のサイクルを30回

繰り返してrCF6 cDNAを得た。同様にhCF6 cDNAは、ヒト腎臓cDNA（クイッククローン cDNAライブラリー、クローンテック（株））を鑄型とし、hCF6-01（配列番号8）およびhCF6-02（配列番号9）をプライマーとするPCR法により得た。反応条件はラットの場合に準じて行った。

配列番号6 5'-ATGACTGTTCAGAGGATCTTCAG-3'

配列番号7 5'-GTCGACTCAGGACTGGGGTTTGTGAG-3'

配列番号8 5'-ATGATTCTTCAGAGGCTCTTCAG-3'

配列番号9 5'-GTCGACTCAGGCCTGGGGTTTCGATG-3'

得られたrCF6 cDNAおよびhCF6 cDNAは1.5% (w/v) アガロース電気泳動の後、SUPREC-01（宝酒造（株））にて回収し、エンテロキナーゼによりrCF6またはhCF6を切り出すことが可能なキメラタンパク質遺伝子を作成するための鑄型として用いた。

エンテロキナーゼ認識配列を付加したrCF6およびhCF6 cDNAの調製

エンテロキナーゼによりrCF6およびhCF6を切り出し可能なキメラタンパク質遺伝子を作成するためにrCF6またはhCF6のN末端側をコードする遺伝子の5'側にAsp-Asp-Asp-Lysをコードする遺伝子配列および制限酵素Eco RI認識配列を持つDNAオリゴマーを合成した(rCF6E;配列番号10およびhCF6E;配列番号11)。

配列番号10

5'-GAATTGACGATGACGATAAGAATAAGGAACCTTGATCCTGTACAG-3'

配列番号11

5'-GAATTGACGATGACGATAAGAATAAGGAACCTTGATCCTATACAGA-3'

配列番号10のDNA配列はrCF6 cDNAを鑄型とし、rCF6E（配列番号10）およびrCF6-02（配列番号7）をプライマーとするPCR法により導入した。PCRの耐熱性DNAポリメラーゼにはTaq DNAポリメラーゼ（ファルマシア（株））を用いた。すなわち、rCF6cDNA 1μL、10x反応バッファー5μL、1.25mM dNTPミックス8μL、rCF6-01 0.5μL、rCF6-02 0.5μL、滅菌水25μLからなる反応液を96℃、1分；60℃、1分；72℃、30秒のサイクルを8回繰り返してエンテロキナーゼ認識配列および制限酵素Eco RI認識配列を5'側に持つrCF6 cDNAを得た。増幅したDNA断片は、pCRIIにクローニング(pCRrCF6EK)し、塩基配列を確認した。同様に配列番号

11のDNA配列はhCF6 cDNAを錆型とし、hCF6E（配列番号11）およびhCF6-02（配列番号9）をプライマーとするPCR法により導入した。反応条件はラットの場合に準じて行った。増幅したDNA断片は、pCRIIにクローニング（pCRhCF6EK）し、塩基配列の確認した。

キメラタンパク質発現ベクターの構築

プラスミドpCRrCF6EKおよびpCRhCF6EKを制限酵素Eco RIおよびSal Iで切断し、0.3kbからなるEco RI-Sal I DNA断片rCF6EKおよびhCF6EKを得た。これらのDNA断片は、エンテロキナーゼの認識配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lys（配列番号3）がN末端に付加したrCF6またはhCF6を含むタンパク質をコードするDNA塩基配列を有し、その上流に制限酵素Eco RI、下流に制限酵素Sal I部位を有する。プラスミドpGP#19RIを制限酵素Eco RIとSal Iで切断後、ベクター部分を含む約3.5kb DNA断片を調製した。これとDNA断片rCF6EKまたはhCF6EKを連結し、それぞれプラスミドpG139SrCF6EKとpG139ShCF6EKを得た（図1）。

キメラタンパク質発現と精製

プラスミドpG139SrCF6EKまたはpG139ShCF6EKを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、JM109[pG139SrCF6EK]およびJM109[pG139ShCF6EK]を得た。JM109[pG139SrCF6EK]およびJM109[pG139ShCF6EK]は、3Lジャーファメンターを用い10 μ g/mLテトラサイクリンを含むSB培地で、37°Cで通気攪拌培養した。8時間後、最終濃度1mMになるようにIPTGを添加しさらに一晩培養した。培養液3Lは、6000rpm、4°Cにて10分間遠心（20PR-52D；日立製作所（株））し、菌体を回収した。菌体を、0.5%（w/v）Triton X-100を含む20mMトリス塩酸（pH7.0）、1mM EDTAに懸濁し、超音波により菌体を破碎後、6000rpmで、4°Cにて15分間遠心（05PR-22；日立製作所（株））し、インクルージョンボディーとしてキメラタンパク質を沈殿画分に回収した。沈殿画分の溶解、遠心の操作をさらに3回繰り返し、粗精製キメラタンパク質を得た。hCF6キメラタンパク質も同様に調整した。

キメラタンパク質からのhCF6およびrCF6の切り出しと精製

キメラタンパク質から r CF6 を切り出す方法には、切り出し酵素としてファクター Xa 用いる方法がある（参考例 2）。しかし該方法で、キメラタンパク質を可溶化してファクター Xa を作用させるためには、2M 以上の尿素が必要であり、この尿素濃度では、ファクター Xa の活性は 1/10 に低下する。このため、キメラタンパク質の 1/60 という大量のファクター Xa が必要となる。また、尿素存在下のファクター Xa の基質特異性は低く、キメラタンパク質からの r CF6 の切り出し効率は約 8 % と低いものであった。

【0029】

そこで、切り出し酵素としてエンテロキナーゼを用いることで、CF6 の切り出し効率を改善した。まず、粗精製 r CF6 キメラタンパク質 4 mg を 10 M 尿素溶液 1.75 mL に可溶化した後、遠心にて不溶物を取り除いた。上清に 10 x EK バッファー（200 mM トリス塩酸（pH 8.0）、500 mM NaCl、20 mM CaCl₂）0.5 mL、30 U（約 3.4 μg、基質の約 1200 分の 1 量）のエンテロキナーゼ（ストラタジーン（株））を添加し、蒸留水で 5 mL とした。22°C で一晩反応後、反応液を SepPak 18（ウォーターズ（株））にかけてペプチドを吸着させた。吸着したペプチドは 0.1% (v/v) TFA を含む 80% (v/v) のアセトニトリル溶液に溶出した。溶出液は凍結乾燥後、0.1% (v/v) TFA に溶解し、1/10 量を YMC-ODS-A302 (d4.6 mm × 150 mm) を接続した HPLC に供し、サンプルロード後約 14.2 分に溶出されるピークを r CF6 画分として分取した（図 2）。同様の操作を 10 回繰り返して、この溶出画分をまとめ粗精製 r CF6 とした。

【0030】

粗精製 r CF6 画分は、凍結乾燥後 0.1% TFA に溶解し、YMC-ODS-AM-323 を接続した HPLC にて精製した（図 3、%B：40% 43 / 18 分；流速 2.5 mL/分）。約 14.2 分に溶出するピークは、分取後凍結乾燥し、r CF6 標品とした。r CF6 の構造は、質量分析計 MALDI-TOFMS（Voyager Elite；日本バーセブティブ（株））でシングルピークであり、分子量が理論値とほぼ一致すること、さらに、アミノ酸配列分析計（PPSQ-10；島津製作所（株））を用いて N 末端 10 アミノ酸が r CF6 のそれと同一であることによって、確認した。

【0031】

hCF6 のキメラタンパク質からの切り出しと精製は、*rCF6*の場合と同様に行つた。*hCF6*は、最初のHPLCでは約18.0分に溶出した（図4）。再クロマトの精製では約10.5分に溶出した（図5、溶出濃度勾配、%B：45 - 48 / 18分）。構造は*rCF6*の場合と同様にして確認した。

*hCF6*および*rCF6*は、400mgのキメラタンパク質から、それぞれ、約210μgおよび約290μg得られ、切り出し効率は、それぞれ約15%および約20%であり、切り出し酵素としてファクターXaを用いた場合（回収率8%）に比して、2~2.5倍に改善した。

● 【実施例2】ラット血液中CF6の測定

抗ラットCF6ウサギ抗体（抗*rCF6*抗体）の作製

rCF6（配列番号2）のC末端19アミノ酸のN端にシステインを付加した計20アミノ酸からなるペプチド（CFPTFNFEDPKFEVLDKPQS：C-*rCF6*（58-76）：配列番号12）をFmoc固層法により合成し、C-18カラムを用いたHPLCにて精製した。合成ペプチドのN末端のシステインを介してキャリアータンパクであるキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に結合させ、免疫用抗原を作製した。

● 【0032】

動物はニュージーランドホワイト種雌ウサギ2羽を用いた。初回に完全フロイントアジュvant（CFA）で乳化させた抗原をウサギの背部皮下4ヶ所に投与後、その2週、6週、8週後に不完全フロイントアジュvant（IFA）で乳化させた抗原を同様に投与して免疫させた。動物の全血液を採血し、抗血清を得た。抗血清の抗体価を、抗原を固定化したELISAにて測定した。免疫前のウサギの血清の抗体価が50以下で、免疫したウサギの血清の抗体価は、それぞれ59600と81400であった。抗体は、抗原ペプチド6mgを結合させたアガロースゲルアフィニティーカラム（6ml）に、抗血清を添加、洗浄後、低pHで溶出し、精製した（図6）。精製した抗体は濃縮後、0.1%（w/v）NaN₃を含むPBS溶液に対して透析後、使用時まで-80℃で保管した。

*rCF6*濃度の測定方法の設定

r CF6(配列番号2)のC末端19アミノ酸のN端にチロシンを付加した計20アミノ酸からなるペプチド(YFPTFNFEDPKFEVLDKPQS: Y-rCF6(58-76):(配列番号13))をFmoc固層法により合成し、C-18カラムを用いたHPLCにて精製した。Y-rCF6(58-76)の放射性ヨウ素標識(¹²⁵Iラベル化)は、ラクトバーオキシダーゼ法により行い、¹²⁵Iラベル化Y-rCF6(58-76)はC18カラムを用いたHPLCにて精製後、最終濃度0.1%(w/v)の牛血清アルブミンを添加し、使用時まで-80°Cで保管した。

反応系としては、¹²⁵Iラベル化抗原と抗体との反応を、サンプル中の抗原により阻止することによって定量する拮抗阻害系を用いた。すなわち、0.25~32ngのrCF6を含むサンプル100μLとrCF6抗体(2500倍希釈)100μLとを混ぜ12時間反応させた後、これに¹²⁵Iラベル化Y-rCF6(58-76)100μL(20,000cpm)を添加して、さらに1晩反応させた。これに200μg/mLウサギIgG100μLおよび10%(w/v)ポリエチレングリコール6000を含むRIAバッファー(50mM Na₂HPO₄、80mM NaCl、25mM EDTA・2Na、0.05%(w/v)NaN₃、0.5%(w/v)牛血清アルブミン、pH7.4)で60倍希釈した抗ウサギIgGヤギ血清(日本抗体研究所)1mLを添加し、1時間放置した。3,000rpm、30分間遠心後、上清を除き、沈殿の¹²⁵Iをガンマカウンターにて測定した。すべての反応は4°Cで行った。その結果、0.25~1.6ng/100μLの範囲で、沈殿に用量依存的な放射活性が観察された。従って、サンプル中のrCF6濃度の測定方法を設定することができた。

ラット血液中rCF6の測定

前述の測定方法を用い、4週齢の雄性高血圧自然発症ラット(SHR)と正常血圧ラット(WKY)、並びに16週齢のSHRとWKYの血液中rCF6を測定した。

【0033】

各群5匹のラットについて、1/10用量の1%(w/v)EDTA・2Na溶液を含む注射筒を用いて採血した。得られた血液を冷却遠心にかけ、血漿を抽出した。血漿は測定まで-80°Cで保存した。その血漿0.8mLに2N塩酸0.2mLを添加後、4°Cで10分間放置した。次に、4°Cで10,000rpm、30分間遠心し、この上清をSepPakC18カラムに添加、0.1%(v/v)TFA 5mLで3回洗浄

した。カラムから、0.1% (v/v) TFAを含む60% (v/v) アセトニトリル溶液2mlに溶出後、真空下で溶媒を除去し、0.2~0.4mlのRIAバッファーに溶解し、RIA用サンプルとした。これを前述の抗rCF6抗体を用いた上記の測定方法に供した。

【0034】

各群のラットの血漿中rCF6を測定した結果、いずれの群においてもrCF6が血漿中に200pg/ml以上であった。また、4週齢ではSHRとWKYの血漿中rCF6濃度に差がないこと、16週齢ではSHRの血漿中rCF6濃度が有意に増加し、WKYのそれに比べ高かった ($p < 0.05$) (表1)。

【0035】

このようにラット血液中にはrCF6が存在することが初めて明らかになった。また、PGI₂が不足している自然発症高血圧モデル(SHR)において、加齢すなわち高血圧の発症とともに血中rCF6濃度が増加することが認められた。すなわち、PGI₂の不足に起因する高血圧の発症とCF6の血液中の濃度には相関があることが認められた。

【表1】

表1 血漿中rCF6濃度(pg/ml)

| | WKY | SHR |
|------|---------|----------|
| 4週齢 | 414±123 | 216±108 |
| 16週齢 | 294±126 | 2310±813 |

平均±標準偏差

HPLCによるRIA用サンプル中の抗rCF6抗体反応性画分の分子

抗rCF6抗体は、rCF6の58番目から76番目までの断片を抗原として調製した。このため、上記RIA系で評価したCF6量には、rCF6由来C末断片を含むペプチドの量も含まれる。RIAサンプルをHPLCにて分画し、各画分の抗rCF6抗体反応性を調べた。

RIA用サンプルをSepPak 18に吸着させ、0.1% (v/v) TFAを含む60% (v/v) アセトニトリル溶液で溶出した。溶出したサンプルは、凍結乾燥後、0.1% (v/v) TFAに溶解し、Inertsil ODS-2 C18 (d4.6mm×250mm) カラム (GL

サイエンス(株)を接続したHPLCにて分離、分画した(0.1% (v/v) TFAを含む20% (v/v) アセトニトリル溶液溶液で5分以上洗浄後、20-60%アセトニトリル直線勾配/30分で溶出)。抗rCF6抗体を用いた上記測定系での抗体反応性の90%以上がrCF6と同じ画分に溶出することが確認された。

すなわち、血液中に存在する抗rCF6抗体反応性分子の90%以上は、rCF6由来C末端片を含むペプチドではなく、rCF6であることが示唆された。

[実施例3] 抗hCF6ウサギ抗体(抗hCF6抗体)の作製とhCF6測定系の構築

免疫用抗原に、hCF6(配列番号1)のN末端10~27アミノ酸のN端にシステインを付加した計19アミノ酸からなるペプチド(CLFVDKIREYKSKRQTSGG: C-hCF6(10-27):配列番号14)とKLHとの結合物を用い、【実施例2】と同様にして、hCF6に対する抗血清を得た。免疫したウサギの血清の抗体価は、それぞれ123,000と121,300であった。抗hCF6抗体は【実施例2】と同様に精製した。hCF6の測定系は、¹²⁵Iラベル化ペプチドにhCF6(配列番号2)のN末端10~27アミノ酸からなるペプチド(LFVDKIREYKSKRQTSGG: hCF6(10-27);配列番号15)を、標準品としてhCF6を用いた以外は、rCF6測定系と同様にして作製した。

[実施例4] 抗rCF6抗体のラット血圧に与える影響

抗rCF6抗体のラット血圧に与える影響

16週齢のSHRとWKYを麻酔後、大腿静脈から抗rCF6抗体(0.3, 1.0, 3.0 μg/kg)をボーラス投与し、動脈圧を頸動脈より観血的に測定した。その結果、SHRでは、抗rCF6抗体投与により平均動脈圧が低下し、その低下度は用量依存的であった(図7および図8)。一方、WKYでは抗rCF6抗体投与により有意な血圧変動は示さなかった(図8)。また、非特異的ウサギ抗体(IgG: 10 μg/kg)の投与は、SHRとWKYの動脈圧に影響を与えたなかった。

抗rCF6抗体前投与がブラジキニンのラット血圧低下に与える影響

ブラジキニンのラット血圧低下作用に与える抗rCF6抗体の影響を調べた。1

6週齢のSHRと同週齢のWKYを麻酔後、ブラジキニン（0.3、1.0、3.0 μg/kg）を大腿静脈から累積的にボーラス投与し、動脈圧を頸動脈より観血的に測定した。次に、抗rCF6抗体（3.0 μg/kg）を大腿静脈からボーラス投与後、同様にブラジキニンを投与し、血圧反応を観察した。

【0036】

その結果、ブラジキニン投与はSHRとWKYで、用量依存的に血圧を低下させた
（図9-1および図10）。また、SHRでは、抗rCF6抗体投与によりブラジキニン投与による血圧低下を増強させたが（図9-2および図10）、WKYでは影響を与えたなかった（図10）。

このように、抗rCF6抗体は、rCF6濃度が上昇している高血圧の状態においてのみ、降圧作用を示し、CF6の阻害が、血液中のCF6の過剰に起因する疾患の症状の改善に有効であることが示された。

【実施例5】 rCF6投与がラット血圧に与える影響

rCF6がラットの血圧に与える影響を調べた。15週齢のSHRを麻酔後、大腿静脈からrCF6（0.2 μg/kg）をボーラス投与し、動脈圧を頸動脈より観血的に測定した。rCF6の投与により、10~15 mmHgの平均動脈圧が上昇した（図11）。

このように、血液中のCF6濃度の上昇が、SHRにおける高血圧を惹起することが示された。実施例4での抗rCF6抗体によるSHR血圧の降下作用の結果と合わせると、CF6アゴニストおよびCF6分泌阻害薬は、血液中のCF6の過剰に起因する疾患にである高血圧において根治的な治療薬になり得る。すなわち、血中CF6濃度の制御は、血中CF6濃度の異常に起因する疾患の治疗方法として有効であることが示唆された。

【参考例1】 プロスタサイクリン産生抑制因子の同定

プロスタサイクリン産生抑制因子は以下に示す方法によってCF6と同定した。
 187匹のSHR（16~20週齢）の心臓（152g、沸騰水中に10分間放置）から、1N酢酸を抽出液としてペプチドを抽出した。抽出物は、Sephadex G-25（1.5 x 30 cm）に供し、0.5 mlずつ分画した（流速3 ml/分；図12）。

活性画分（19-21）は、InertsilODS-2 C18（d4.6mm X 250mm）カラム（G Lサイエンス（株））を接続したHPLCにて分離、精製した（0.1%（v/v）TFAを含む20%（v/v）アセトニトリル溶液で5分以上洗浄後、20-60%アセトニトリル直線勾配/30分で溶出、流速1ml/分；図13）。活性は、SHRの腸管膜動脈から採取した平滑筋細胞からの上清中へ分泌される6-ケト-PGF₁αを測定し、評価した。精製したペプチド（図14）は、アミノ酸配列分析計（PPSQ-10；島津製作所（株））を用いて、N末端から39アミノ酸（NKELDPVQKLFLDKIREYKAKRLASGGPVDTGPEYQQEV；配列番号2の1~39アミノ酸；配列番号16）を、またAsnN分解後の断片をYMC-ODS-A302（d4.6mmX150mm）を接続したHPLCにて精製し、DRELFKLKQMYGKGEM（；配列番号2の40~55アミノ酸；配列番号17）、DKFPTFNFE（；配列番号2の56~64アミノ酸；配列番号18）、DPKFEVL（；配列番号2の65~71アミノ酸；配列番号19）、DKPQS（；配列番号2の72~76アミノ酸；配列番号20）の配列を決定した。これらの配列は、ラットプロトン輸送性ATP合成酵素のサブユニットであるrCF6（配列番号2）と完全に一致した。

[参考例2] キメラタンパク質発現法によるCF6の調製-2

キメラタンパク質からの切り出し酵素としてファクターXaを用いる、rCF6（配列番号2）の製造方法を以下に示す。

rCF6 DNAの調製

N末端にファクターXa認識配列であるIle Glu Gly Lys配列（配列番号21）を付加したrCF6タンパク質をコードする遺伝子を含むDNA断片をPCRで得た。鑄型として、100°Cで1分間処理したラット大動脈cDNAライブラリー（クロンテック（株））を使用し、プライマーとしてCF03（配列番号22）およびCF04（配列番号23）を用いた。

DNA断片はpCRIIにクローニング（pCRII rCF6Xa）後、DNA塩基配列を決定し、その構造を確認した。

配列番号22 5'-GATCGAGGGACGTAATAAGGAACCTTGATCCT-3'

配列番号23 5'-GTCCGACTTAGGACTGGGGTTGTGCA-3'

発現ベクターの構築

プラスミド p C R I I r C F 6 Xa を制限酵素 Eco RI および Sal I で切断し、0.3kb からなる Eco RI-Sal I DNA 断片を得た。このDNA断片は、プラスミド p C R I I DNA 由来の Glu-Phe-Gly-Leu 配列の C 末端にファクター Xa の認識配列 Ile-Glu-Gly-Lys が結合した Glu-Phe-Gly-Leu-Ile-Glu-Gly-Lys 配列（配列番号 24）が r C F 6 の N 末端に付加したタンパク質をコードする DNA 塩基配列を有し、その上流に制限酵素 Eco RI 、下流に制限酵素 Sal I 部位を有する。プラスミド p G 9 7 S 4 D h C T [G] を制限酵素 Eco RI と Sal I で切断後、ベクター部分を含む約 3.5 kb DNA 断片を調製した。これと 0.3kb からなる Eco RI-Sal I DNA 断片を連結し、プラスミド p G 9 7 S DrCF6Xa を得た（図 15）。

r CF6 キメラタンパク質発現と精製

プラスミド p G 9 7 S DrCF6Xa を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、JM109 [p G 9 7 S DrCF6Xa] を得た。JM109 [p G 9 7 S DrCF6Xa] を、10 μg/mL テトラサイクリンを含む LB 培地に接種し、37°C で 6 時間培養した。最終濁度 (OD 660 nm) が 0.1 になるよう培養液を 10 μg/mL テトラサイクリンと 5 mM IPTG を含む SB 培地に接種し、37°C で 16 時間培養した。

培養液を 6000 rpm 、 4°C にて 10 分間遠心 (20PR-52D 、日立製作所 (株)) し、菌体を回収した。菌体を、1 mM EDTA · Na を含む 20 mM トリス塩酸 (pH 8.0) に懸濁し、フレンチプレスにて破碎した (10,000 psi; 2 回) 。

菌体破碎液を 8000 rpm 、 4°C にて 20 分間遠心 (05PR-22 、日立製作所 (株)) した。沈殿を 0.5% (w/w) Triton X-100 を含む 20 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 30 mL に懸濁後、3000 rpm 、 4°C にて 15 分間遠心し、沈殿を回収した。この操作を 4 回繰り返し、粗精製キメラタンパク質とした。

キメラタンパク質からの r CF6 の切り出しと精製

キメラタンパク質からの切り出しは、3 mg/mL 粗精製キメラタンパク質濃度で 50 μg/mL ファクター Xa (宝酒造 (株)) を用い、2M 尿素を含む 50 mM 20 mM トリス塩酸 (pH 8.0) 、100 mM NaCl 、1 mM CaCl₂

²溶液中で、37℃4時間反応させた。反応液はSepPakC18カラムに吸着後、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸で洗浄し、0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を含む80% (v/v) アセトニトリル溶液にペプチドを回収した。溶出液は凍結乾燥後、0.1% (v/v) TFAに溶解し、rCF6はYMC-ODS-A302を接続したHPLCにて精製した (%B: 35-50/30分; 14.5分に溶出)。
rCF6の構造は実施例1と同様にして確認した。

ただし、本方法におけるキメラタンパク質からのrCF6の切り出し効率は約8%と低く、大量のCF6が必要となるイン・ビボの試験などを実施するためには、さらに効率的なCF6の製造方法が必要であると思われた。

[参考例3] CF6のプロスタサイクリン産生抑制

参考例2で調製した、1、10、100nMのrCF6を含むDMEMでHUVECを37℃、30分培養し、CF6によるPGI₂産生抑制を調べた。PGI₂産生は培地中に分泌されるPGI₂の安定代謝物である6-ケト-PGF₁α量を指標とした。その結果、CF6は用量依存的にPGI₂産生を抑制した(図16)。1μMのブラジキニン存在下でも同様の試験を行い、CF6はブラジキニンによるPGI₂産生上昇を用量依存的に抑制することがわかった(図17)。

さらに、10nMのCF6は、2μg/mlイオノマイシンによるPGI₂産生上昇を抑制したが、細胞外から添加した10ng/mlアラキドン酸および10ng/ml PGH₂によるPGI₂産生上昇を抑制しなかった。

[0037]

PGI₂は、リン脂質を出発物質として産生される。すなわち、リン脂質からPLA₂により切り出されたアラキドン酸が、シクロオキシゲナーゼによりPGH₂に変換され、さらにPGI₂合成酵素により変換される。イオノマイシンは、この反応中のPLA₂の活性化、すなわち、リン脂質からのアラキドン酸が切り出しを促進する。

[0038]

従って、CF6の作用が、アラキドン酸や、アラキドン酸カスケードの下流の産物であるPGH₂からのPGI₂産生を抑制しないこと、および、PLA₂の活性化に基づくPGI₂産生を抑制することから、CF6のPGI₂産生抑制作用は、PLA₂作用

の阻害であることが示された。

[参考例4] CF6のアラキドン酸の遊離抑制作用

参考例3から、CF6のPGI₂産生抑制作用が、PLA₂作用の阻害に基づくことが示された。一方、脂肪酸からアラキドン酸を遊離するPLA₂は、構造および生化学的な性質から大きく、Ca²⁺依存性細胞質型PLA₂(cPLA₂)、Ca²⁺依存性分泌型PLA₂(sPLA₂)、Ca²⁺非依存型PLA₂(iPLA₂)に3つに分けられる。それぞれの阻害剤を用いて、CF6がどのPLA₂を阻害しているかを検討した。

【0039】

HUVECを [³H] 標識アラキドン酸存在下で24時間培養後、培地をDMEMに変え、さらに1、10、100nMのCF6存在下で37°C、30分培養し、培養液中の [³H] 標識アラキドン酸の遊離を調べた。その結果、CF6は用量依存的に [³H] 標識アラキドン酸の遊離を抑制した(図18)。さらに同様の試験を1μMのブラジキニン存在下で行い、CF6はブラジキニンによる [³H] 標識アラキドン酸の遊離促進作用を用量依存的に抑制することがわかった(図19)。

次に、1μMのブラジキニン存在下または非存在下における、cPLA₂阻害剤(40μM AACOCF₃; アラキドン酸3フルオロメチルケトン)、sPLA₂阻害剤(1μM OPC; オレイルオキシエチルホスホリルコリン)、またはiPLA₂阻害剤(1μM BEL; プロモエノールコリン)によるHUVECからのアラキドン酸遊離の抑制作用を調べた。その結果、HUVECにおいては、cPLA₂阻害剤のみがアラキドン酸遊離を抑制すること、すなわち、HUVECからのアラキドン酸遊離に関わるPLA₂はcPLA₂であることがわかった(図20、21)。

【0040】

cPLA₂は、アラキドン酸含有リン脂質に高い特異性を示し、μMオーダーのCa²⁺濃度で選択的にアラキドン酸を遊離する。cPLA₂過剰発現マウスやcPLA₂欠損マウスを用いた実験から、cPLA₂は即時相のアラキドン酸の代謝のみならず、炎症反応で重要なアラキドン酸の遅延相のにおいても重要なことが明らかになり、cPLA₂の阻害は強い炎症反応を示すことが期待されている(Uozumi N., et al 1390 618-622, 1997)。

【0041】

【発明の効果】

本発明により、CF6特異的な抗体が提供され、本因子が関与する病態の診断方法が提供される。また、本発明により、血液中CF6の活性阻害に基づく正常血圧を低下させない高血圧等の疾患の治疗方法が提供される。さらに、本発明に基づく診断方法により、血液中のCF6が増加または減少した病態の治疗方法も提供される。

【0042】

【配列表】

1. 一般情報

- (1) 出願人： サントリー株式会社
- (2) 発明の名称： カップリングファクター6及びその抗体の新規用途
- (3) 配列の数： 24

2. 配列に関する情報

配列番号： 1

配列の長さ： 76

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asn Lys Glu Leu Asp Pro Ile Gln Lys Leu
 Phe Val Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys Ser
 Lys Arg Gln Thr Ser Gly Gly Pro Val Asp
 Ala Ser Ser Glu Tyr Gln Gln Glu Leu Glu
 Arg Glu Leu Phe Lys Leu Lys Gln Met Phe
 Gly Asn Ala Asp Met Asn Thr Phe Pro Thr
 Phe Lys Phe Glu Asp Pro Lys Phe Glu Val
 Leu Glu Lys Pro Gln Ala

配列番号： 2

配列の長さ： 76

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asn Lys Glu Leu Asp Pro Val Gln Lys Leu

Phe Leu Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys Ala

Lys Arg Leu Ala Ser Gly Gly Pro Val Asp

Thr Gly Pro Glu Tyr Gln Gln Glu Val Asp

Arg Glu Leu Phe Lys Leu Lys Gln Met Tyr

Gly Lys Gly Glu Met Asp Lys Phe Pro Thr

Phe Asn Phe Glu Asp Pro Lys Phe Glu Val

Leu Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 3

配列の長さ： 5

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Asp Asp Asp Lys

配列番号： 4

配列の長さ： 139

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列：

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp

1

5

10

15

Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro

20

25

30

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser
 35 40 45

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro
 50 55 60

Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Leu Leu Glu Ser Asp Leu Pro Glu
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp
 85 90 95

Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro Pro
 100 105 110

Phe Val Pro Thr Glu Asn Pro Thr Gly Ser Tyr Ser Leu Thr Phe Asn
 115 120 125

Val Asp Glu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr
 130 135

配列番号： 5

配列の長さ： 97

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列：

Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro

20 25 30

Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser

35 40 45

Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe Pro

| | | | |
|---|----|----|----|
| 50 | 55 | 60 | |
| Ala Pro Glu Ala Val Pro Asp Ser Leu Leu Asp Ser Asp Leu Pro Glu | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr Asp | | | |
| 85 | 90 | 95 | |

Ala

配列番号： 6

配列の長さ： 23

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： ATGACTGTTAGAGGATCTTCAG

配列番号： 7

配列の長さ： 27

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GTCGACTCAGGACTGGGGTTGTGAG

配列番号： 8

配列の長さ： 23

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： ATGATTCTTCAGAGGCTTCA

配列番号： 9

配列の長さ： 28

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GTCGACTCAGGCCTGGGGTTTTCGATG

配列番号： 10

配列の長さ： 45

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GAATTGACGATGACGATAAGAATAAGGAACTTGATCCTGTACAG

配列番号： 11

配列の長さ： 46

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GAATTGACGATGACGATAAGAATAAGGAACTTGATCCTATAACAGA

配列番号： 12

配列の長さ： 20

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Cys Phe Pro Thr Phe Asn Phe Glu Asp Pro

Lys Phe Glu Val Leu Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 13

配列の長さ： 20

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Tyr Phe Pro Thr Phe Asn Phe Glu Asp Pro

Lys Phe Glu Val Leu Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 14

配列の長さ： 19

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Cys Leu Phe Val Asp Lys Ile Arg Glu Tyr

Lys Ser Lys Arg Gln Thr Ser Gly Gly

配列番号： 15

配列の長さ： 18

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Leu Phe Val Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys

Ser Lys Arg Gln Thr Ser Gly Gly

配列番号： 16

配列の長さ： 39

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asn Lys Glu Leu Asp Pro Val Gln Lys Leu
Phe Leu Asp Lys Ile Arg Glu Tyr Lys Ala
Lys Arg Leu Ala Ser Gly Gly Pro Val Asp
Thr Gly Pro Glu Tyr Gln Gln Glu Val

配列番号： 17

配列の長さ： 16

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Arg Glu Leu Phe Lys Leu Lys Gln Met
Tyr Gly Lys Gly Glu Met

配列番号： 18

配列の長さ： 9

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Lys Phe Pro Thr Phe Asn Phe Glu

配列番号： 19

配列の長さ： 7

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Pro Lys Phe Glu Val Leu

配列番号： 20

配列の長さ： 5

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Asp Lys Pro Gln Ser

配列番号： 21

配列の長さ： 4

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Ile Glu Gly Lys

配列番号： 22

配列の長さ： 31

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GATCGAGGGACGTAATAAGGAACTTGATCCT

配列番号： 23

配列の長さ： 26

配列の型： ヌクレオチド

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： DNA

配列： GTCGACTTAGGACTGGGGTTGTCGA

配列番号： 24

配列の長さ： 8

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列： Glu Phe Gly Leu Ile Glu Gly Lys

【図面の簡単な説明】

【図1】 ラット肝臓cDNAライブラリー又はヒト腎臓cDNAライブラリーから、rCF6又はhCF6をエンテロキナーゼにより切り出すことが可能なキメラタンパク質として発現するためのベクターの構築を示す。

【図2】 発現したrCF6含有キメラタンパク質をエンテロキナーゼで処理した溶液のC18-HPLCの溶出曲線である。

【図3】 粗精製rCF6のC18-HPLCの溶出曲線である。

【図4】 発現したhCF6含有キメラタンパク質をエンテロキナーゼで処理した溶液のC18-HPLCの溶出曲線である。

【図5】 粗精製rCF6のC18-HPLCの溶出曲線である。

【図6】 rCF6から誘導された免疫抗原をウサギに投与して作成された抗血清、及び抗体ペプチドを結合させたアガロースゲルアフィニティカラムにて精製した抗体の電気泳動ゲルの結果を示す。

【図7】 抗rCF6抗体がSHR(16週齢)の血圧に与える影響を示すチャートである。

【図8】 抗rCF6抗体がラット(SHR、WKY、16週齢)の血圧に与える影響を示すグラフである。

【図9】 抗rCF6抗体の前投与が、プラジキニンによるラット(SHR、16週齢)血圧低下に与える影響を示すチャートである。

【図10】 抗rCF6抗体の前投与が、プラジキニンによるラット(SHR、WKY、16週齢)血圧低下に与える影響を示すグラフである。

【図11】 rCF6がSHR(15週齢)の血圧に与える影響を示すチャートである。

【図12】 SHRの心臓からの沸騰水抽出液を、セファデックスG-25で分画したチャートである。

【図13】 上記図12の活性画分をHPLCにかけて得られたチャートであ

る。

【図14】 上記図13の活性画分をHPLCにかけて得られたチャートである。

【図15】 ラット大動脈cDNAライブラリーから、ファクターXaの認識配列がN末端に付加されたrCF6を含むタンパク質発現用ベクターの構築を示す図である。

【図16】 rDF6によるPGI2の產生抑制を示すグラフである。

【図17】 ブラジキニン存在下におけるrDF6によるPGI2の產生抑制を示すグラフである。

【図18】 HUVECからのアラキドン酸遊離に対するrCF6の影響を示すグラフである。

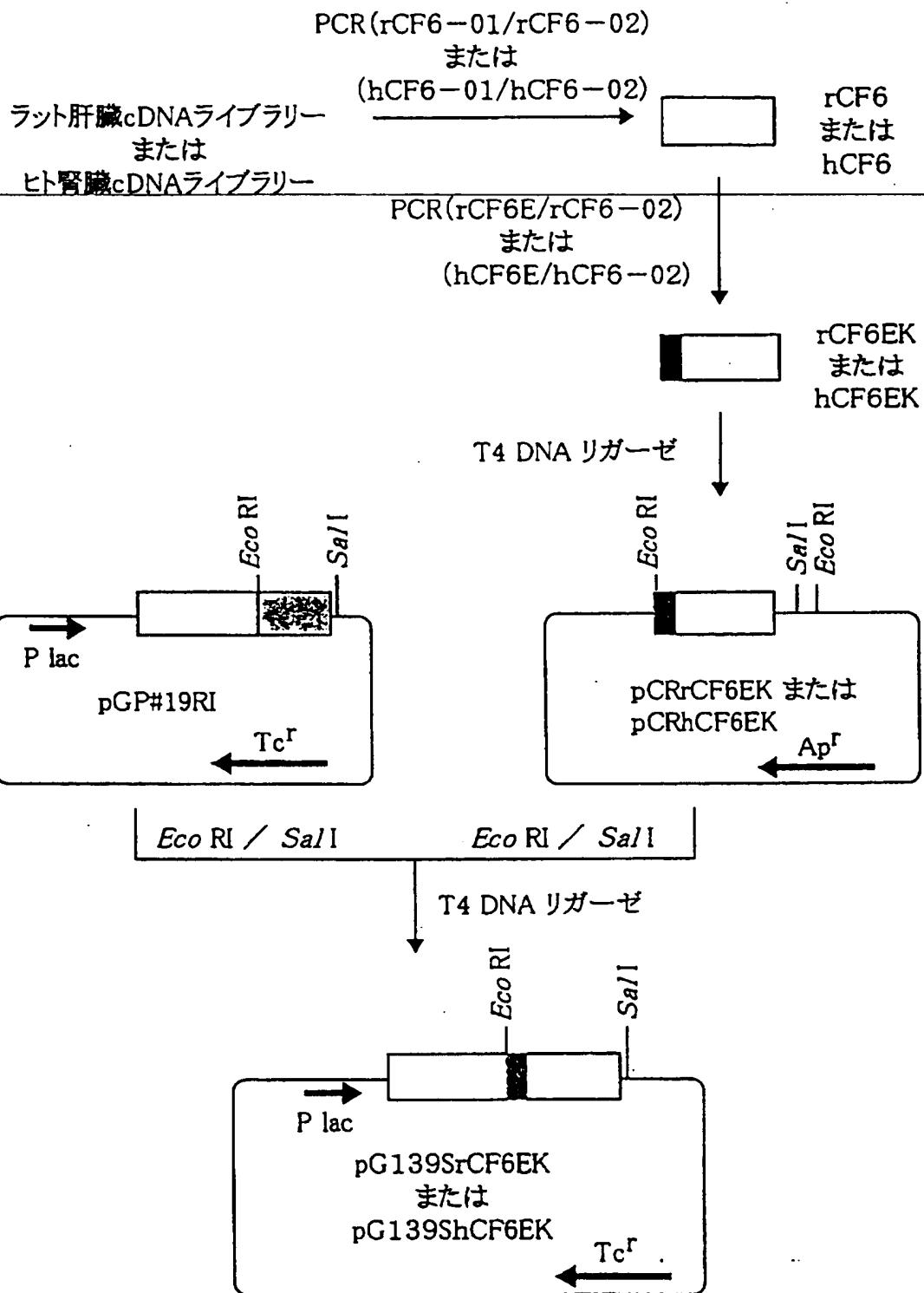
【図19】 ブラジキニンによるHUVECからのアラキドン酸遊離作用に対するrCF6の影響を示すグラフである。

【図20】 各種PLA₂阻害薬およびrCF6がHUVECからのアラキドン酸遊離に対する影響を示すグラフである。

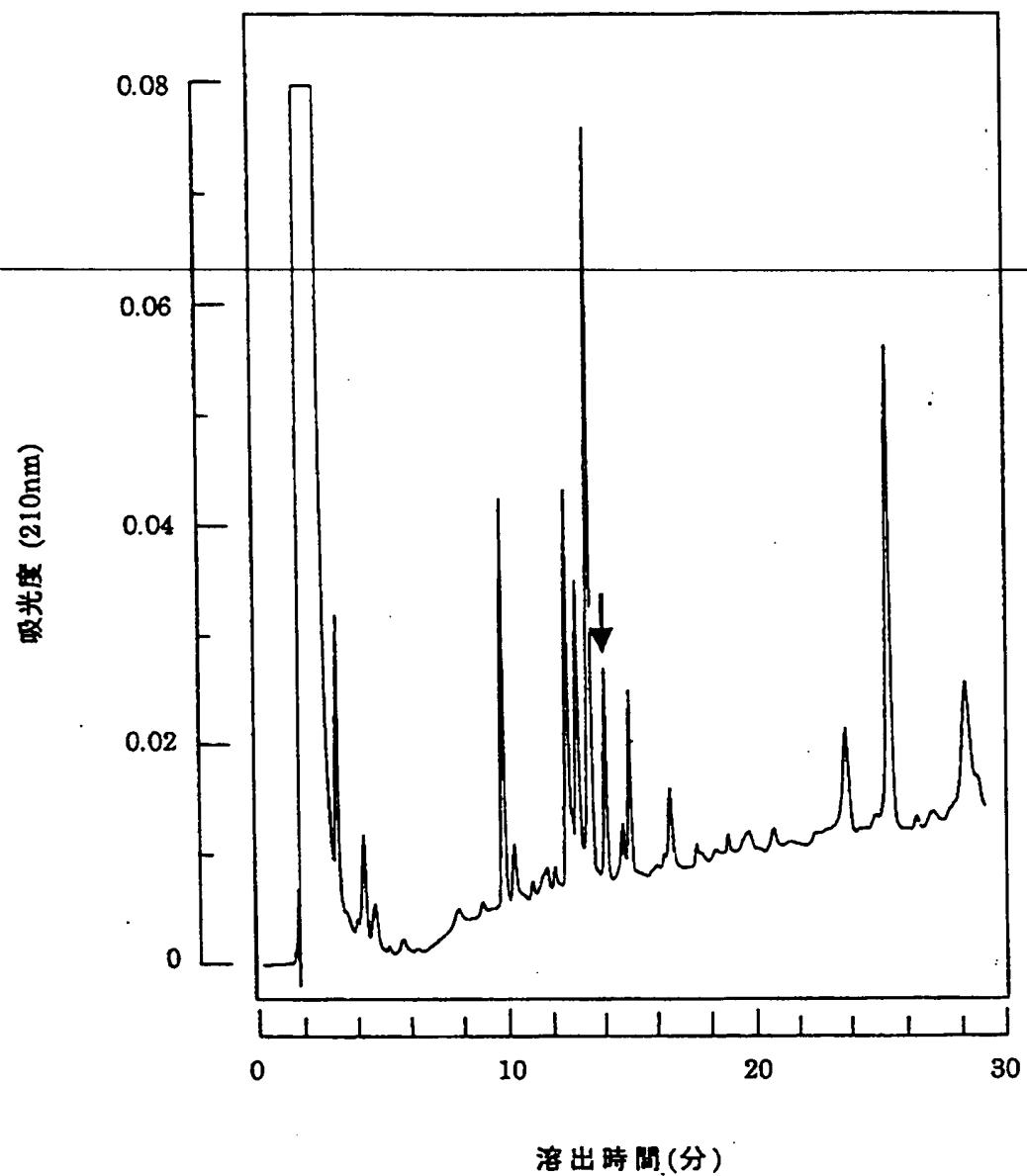
【図21】 各種PLA₂阻害薬およびrCF6が、ブラジキニンによるHUVECからのアラキドン酸遊離に対する影響を示すグラフである。

【書類名】 図面

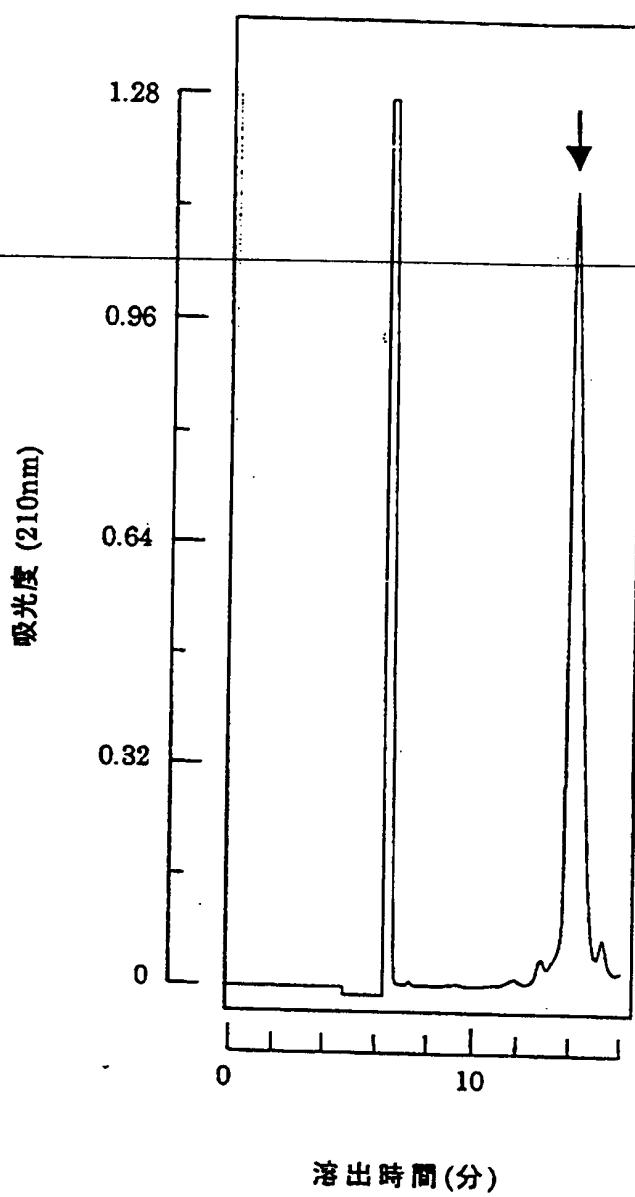
【図1】



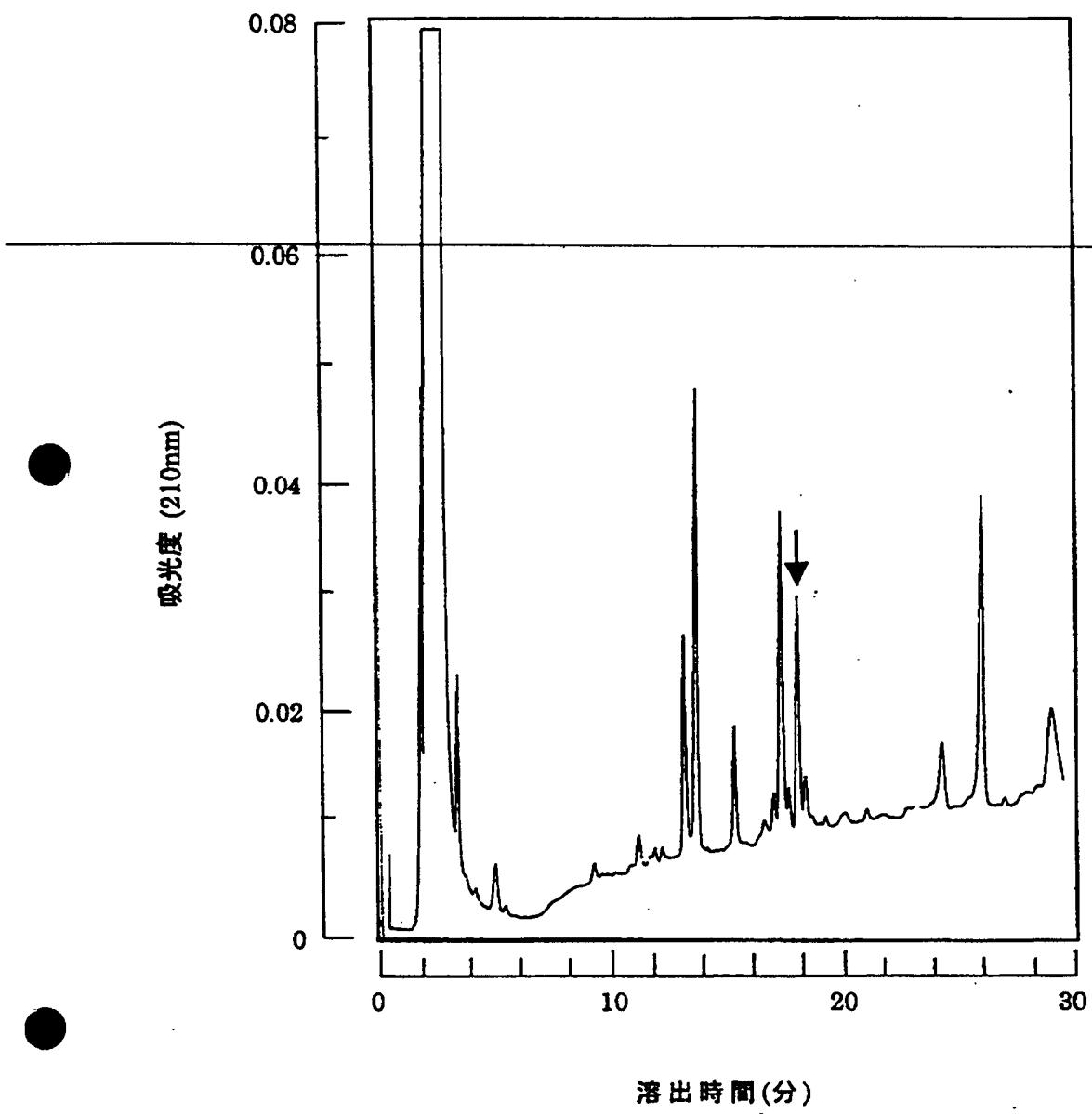
【図2】



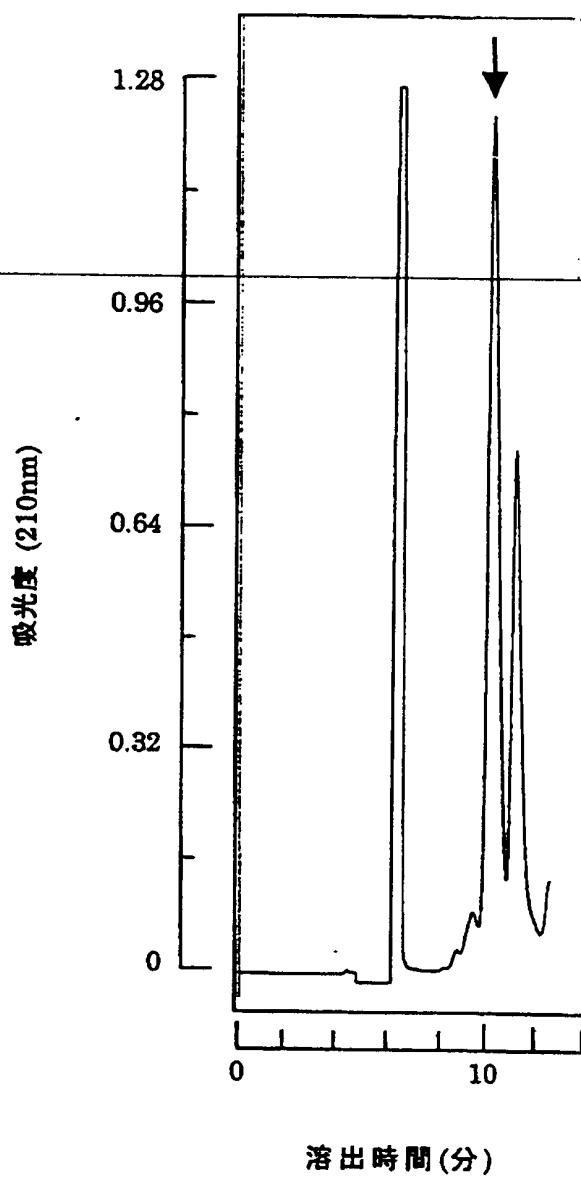
【図3】



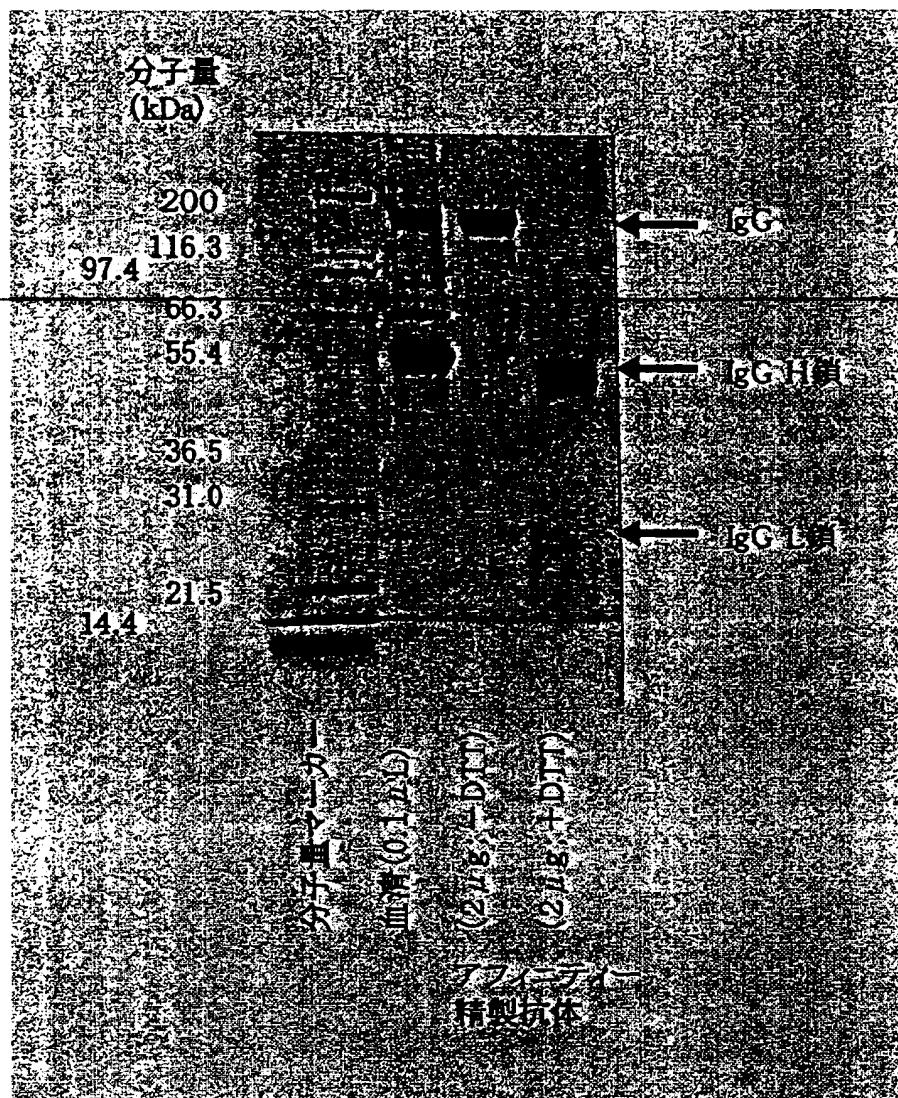
【図4】



【図5】



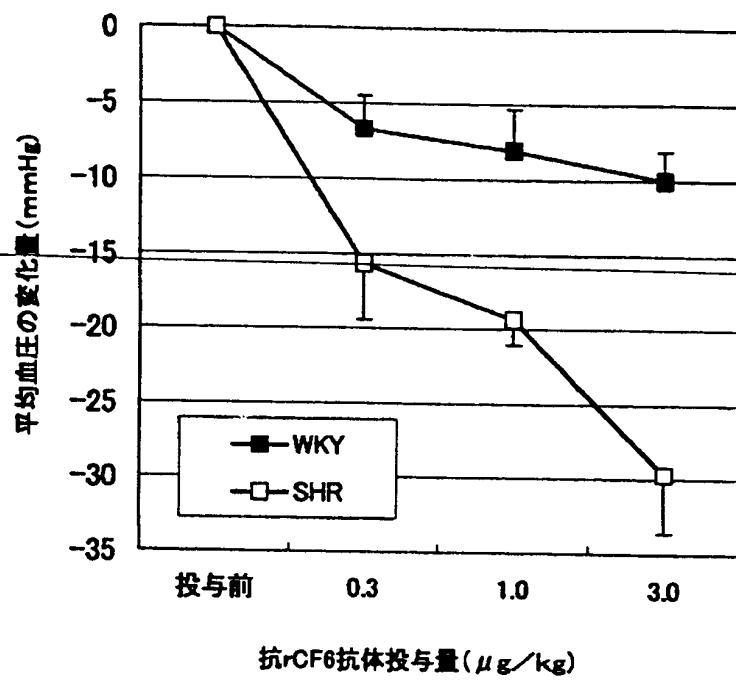
【図6】



【図7】



【図8】



出願人履歴情報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名 サントリー株式会社